Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 15, No. 1 Spring 2023, p. 39-49

Effects of Different Water Amount in Total Mixed Ration on Performance, Rumen Hydrolytic Enzymes Activity and Rumen and Blood Metabolites of Fattening Lambs

Zahra Yousefi[1], Ayoub Azizi [2*], Amir Fadayifar[2], Ali Kiani[3], Afrooz Sharifi[4]

Received: 23-11-2021
Revised: 25-08-2022
Accepted: 30-08-2022
Available Online: 30-08-2022

How to cite this article:
Yousefi, Z., Azizi, A., Fadayifar, A., Kiani, A., & Sharifi, A. (2023). Effects of different water in total mixed ration on performance, rumen hydrolytic enzymes activity and rumen and blood metabolites of fattening lambs. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(1), 39-49.
DOI: 10.22067/ijasr.2022.73809.1053

Introduction: Over the last half century, the shortage of animal feed in many parts of the world, including Iran, has increased the feed costs of animal husbandry and it also has affected revenues from the production of livestock products. Therefore, any improvement in nutritional management and increasing the feed use efficiency in this sector will increase productivity and production. Adding water to ruminant diets is inexpensive physical processing method that has had a positive effect on efficiency of ruminant production. Traditionally, adding water to total mixed diets has been a useful management practice to reduce feed selection behavior by livestock. It has been shown that adding water to the feed of adult cows (decreasing dietary dry matter (DM) from 81% to 64%) reduced the choice of fine components over long particles and also to reduce the preferential consumption of concentrate components (Leonardi *et al.*, 2005). Recent studies have shown that adding water to the starter diet of suckling calves up to 25% during the winter has improved their growth performance (Beiranvand *et al.*, 2018). These positive responses are probably due to the increased adhesion of feed particles, which has led to a reduction of diet dust, condensation of fine particles and increased palatability and consumption.

Materials and Methods: This experiment was conducted in animal house and laboratories of Lorestan University. Twenty-eight Lori male-fattening lambs with120 ± 6 days old and 33.4 ± 3.4 kg of live weight were used in completely randomized design experiment with 4 treatments and 7 lambs per treatment. Dietary treatments in which water was used at levels 10 (control), 20, 30 and 40 % were fed to the lambs for 56 days. Blood and ruminal samples were taken from all of lambs at day 45 and 50 respectively 3 h after morning feeding. A completely randomised design was used to determine the effect of different levels of water on the measured traits. All data were analyzed using the GLM procedure in SAS. Linear (L) and quadratic (Q) contrast statements were included in the model to test the effect of increasing amounts of water. Differences among means were tested using Duncan method.

Results and Discussion: Results showed that increasing the level of dietary moisture up to 30% linearly increased ($P<0.05$) ruminal ammonia-N, propionate and total VFA concentration, while pH and concentration of other individual VFAs were unchanged among dietary treatments ($P>0.05$). Increasing the level of dietary moisture up to 30% linearly increased ($P<0.05$) activity of carboxymethyl cellulase and ɑ-amylase, while activity of microcrystalline cellulase and filter paper degrading activity and blood metabolites (including glucose, total protein and blood urea nitrogen) were similar among treatments ($P>0.05$). Intake of dry matter (DM) and average daily gain increased linealrly ($P<0.05$) with elevating dietary water level up to 30%, while NDF and ADF intake

1- M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
4- Assistant Professor, Animal Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahvaz, Iran.
*Corresponding Author's Email: azizi.ay@lu.ac.ir

and final body weight and feed conversion ratio was unchanged by the level of dietary moisture (P>0.05).

Conclusion: Results of present study showed that adding water to the total mixed ration of fattening lambs up to 30% improved ruminal parameters, feed intake and growth performance.

Keywords: Dietary moisture, Enzyme activity, Fermentative parameters, Lamb

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی
جلد۱۵، شماره۱، بهار۱۴۰۲، ص ۴۹-۳۹

اثرات سطوح مختلف آب در جیره کاملاً مخلوط بر عملکرد، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و خونی بره‌های پرواری

زهرا یوسفی[۱]، ایوب عزیزی[۲*]، امیر فدایی‌فر[۲]، علی کیانی[۳]، افروز شریفی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۸

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف رطوبت به جیره کاملاً مخلوط بر عملکرد، فعالیت آنزیمی شکمبه، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و خونی بره‌های پرواری بود. در پژوهش حاضر، از ۲۸ رأس بره نژاد لری با میانگین سن ۶±۱۲۰ روزه و میانگین وزن زنده ۳/۴ ± ۳۳/۴ استفاده شد. دام‌ها در چهار تیمار آزمایشی و هفت تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی قرار گرفتند. جیره‌های آزمایشی که در آن‌ها سطوح ۱۰ (شاهد)، ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ درصد رطوبت وجود داشت به‌مدت ۵۶ روز به دام‌ها تغذیه شدند. داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS تجزیه شدند. نتایج نشان داد که غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه تا سطح ۳۰ درصد رطوبت جیره به صورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزایش درصد رطوبت جیره‌های آزمایشی تا سطح ۳۰ درصد باعث افزایش خطی غلظت کل اسیدهای چرب فرار و پروپیونات شکمبه گردید (P<۰/۰۵)، هرچند غلظت pH و سایر اسیدهای چرب فرار شامل استات، بوتیرات، ایزوبوتیرات، والرات، ایزووالرت و نسبت استات به پروپیونات تحت تأثیر درصد رطوبت جیره قرار نگرفت (P>۰/۰۵). با افزایش رطوبت در جیره تا سطح ۳۰ درصد فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و آلفا آمیلاز به‌طور خطی افزایش نشان داد (P<۰/۰۵). هرچند فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی در شکمبه و متابولیت‌های شیمیایی خون شامل گلوکز، پروتئین تام و نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) تحت تأثیر جیره‌ها قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). افزایش سطح رطوبت جیره تا ۳۰ درصد باعث افزایش خطی میزان مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه دام‌ها شد (P<۰/۰۵). هرچند، مصرف NDF و ADF جیره‌ای، وزن نهایی دام‌ها و ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در کل، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن رطوبت به جیره غذایی تا سطح ۳۰ درصد سبب بهبود شرایط هضم و تخمیر شکمبه و به تبع، عملکرد رشد بره‌های پرواری شد.

واژه‌های کلیدی: بره پرواری، رطوبت جیره، فراسنجه‌های تخمیری، فعالیت آنزیمی

مقدمه

طی نیم قرن اخیر کمبود خوراک دام در بسیاری از مناطق جهان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۴- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: azizi.ay@lu.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2022.73809.1053

از جمله ایران سبب افزایش هزینه تغذیه در دامپروری گردیده است و درآمدهای ناشی از تولید فرآورده‌های دامی را نیز تحت تأثیر قرار داده است. در کشورهای توسعه یافته هزینه تولید خوراک دام حدود ۶۰-۵۰ درصد از کل هزینه‌های تولید را شامل می‌شود، این در حالی است در کشورهای در حال توسعه‌ای مانند ایران این میزان به‌طور قابل توجهی بیشتر بوده و حدود ۷۵-۷۰ درصد است (Azizi *et al.*, 2016). لذا، هرگونه بهبود در مدیریت تغذیه و افزایش راندمان استفاده از مواد خوراکی در این بخش افزایش بهره‌وری و تولید را به دنبال خواهد داشت. خواص فیزیکی مواد خوراکی می‌تواند رفتار تغذیه‌ای حیوانات را تحت تأثیر قرار دهد.

افزودن آب به غذای حیوانات نشخوارکننده و سپس تغذیه آن یکی دیگر از روش‌های فرآوری فیزیکی ارزان قیمت و به آسانی قابل انجام به شمار می‌رود که تأثیرات مثبتی روی بازدهی تولید نشخوارکنندگان داشته است. به‌طور سنتی، اضافه کردن آب به‌جیره‌های کامل مخلوط خشک یک عمل مدیریتی مفید برای کاهش رفتار انتخاب خوراک توسط دام در نظر گرفته شده است (Shaver, 2002). نشان داده شده است که اضافه کردن آب به خوراک گاوهای بالغ (کاهش ماده خشک جیره از ۸۱ به ۶۴ در صد) باعث کاهش انتخاب اجزای ریز نسبت به ذرات بلندتر و همچنین کاهش مصرف ترجیحی اجزای کنسانتره‌ای شده است (Leonardi *et al.*, 2005). اخیراً در مطالعاتی مشخص شده است که اضافه کردن آب به جیره آغازین بافت‌دار گوساله‌های شیرخوار در طول زمستان (Beiranvand *et al.*, 2018) تا سطح ۲۵ در صد جیره سبب بهبود عملکرد رشد آن‌ها شده است. در مطالعه دیگری نیز در فصل تابستان، افزودن آب به جیره غذایی آغازین گوساله‌های شیرخوار به‌میزان ۵۰ درصد سبب بهبود عملکرد رشد آن‌ها شده است (Beiranvand *et al.*, 2016). همچنین، تغذیه جیره‌های مرطوب به گاوهای شیری سبب بهبود خوش‌خوراکی جیره و مصرف بیشتر آن شده است (Leonardi *et al.*, 2005). این پاسخ‌های مثبت احتمالاً به‌دلیل افزایش چسبندگی اقلام خوراکی بوده که منجر به کاهش گرد و غبار جیره (Arzola-Álvarez *et al.*, 2010)، متراکم شدن ذرات کوچک‌تر، افزایش خوش‌خوراکی و مصرف بیشتر آن شده است که ممکن است بخش قابل توجهی از کاهش مصرف ماده خشک را نیز جبران کند (Beiranvand *et al.*, 2018). با این وجود، تاکنون مطالعات اندکی درباره بررسی اثرات تغذیه جیره‌های حاوی آب بر عملکرد و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه بره‌های پرواری صورت نگرفته است. لذا، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف رطوبت جیره کامل مخلوط بر عملکرد، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و خونی بره‌های پرواری بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات، جیره‌های آزمایشی و مدیریت پرورش

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۸ در ایستگاه دامپروری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. از ۲۸ رأس بره پرواری نژاد لری با میانگین سن حدود ۶±۱۲۰ روزه و میانگین وزن زنده ۳/۴±۳۳/۴ کیلوگرم استفاده شد. بره‌ها دو هفته قبل از شروع آزمایش علیه بیماری آنتروتوکسمی واکسینه شدند (سه میلی‌لیتر به‌ازای هر بره، شرکت سرم‌سازی رازی). میزان دو میلی‌لیتر شربت ضد انگل کلوزانتل پنج درصد به‌ازای هر ۱۰ کیلوگرم وزن بدن و شربت ضد انگل دامیاکاونیل (نیکلوزوماید) نیز به‌ازای هر ۱۵ کیلوگرم وزن بدن به بره‌ها خورانده شد (هفت تا ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر بره). بره‌ها به‌طور جداگانه در جایگاه‌های انفرادی (۱۵۰×۱۰۰×۱۰۰ سانتی‌متر به‌ترتیب طول، عرض و ارتفاع) با کف چوبی مجهز به سطل آب و خوراک نگهداری شدند. از چهار جیره آزمایشی حاوی سطوح مختلف آب استفاده شد. برای این منظور، ابتدا یک جیره آزمایشی پایه حاوی نسبت علوفه به کنسانتره ۳۰ به ۷۰ بر اساس جداول احتیاجات غذایی NRC بره‌های پرواری فرموله شد (NRC, 2007) و سپس، به‌میزانی آب به جیره‌ها افزوده گردید که هرکدام به‌ترتیب دارای ماده خشک ۹۰ (جیره شاهد و بدون افزودن آب)، ۸۰، ۷۰ و ۶۰ درصد بودند. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است. دو هفته اول به‌عنوان دوره عادت‌پذیری به باکس‌ها و جیره‌های آزمایشی در نظر گرفته شد و سپس دوره اصلی آزمایش به‌میزان ۵۶ روز به‌طول انجامید (جمعاً ۷۰ روز). در طول دوره اصلی آزمایش، دام‌ها در دو نوبت ۰۸:۰۰ صبح و ۱۶:۰۰ عصر با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف آب تغذیه شدند، به‌طوری‌که پنج درصد پسماند در ته آخور باقی ماند. خوراک مصرفی و پسماند هر دام در کل دوره آزمایش ثبت شد. میزان آب مورد نیاز برای افزودن به هر جیره نیز روزانه و قبل از ریختن خوراک به داخل آخور (نیم ساعت قبل از تغذیه) روی جیره‌های غذایی اسپری شد. در کل دوره آزمایش آب و خوراک کافی در اختیار دام‌ها قرار گرفت.

جدول ۱- اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره آزمایشی (بر حسب درصد ماده خشک جیره یا واحد بیان شده)

Table 1- Ingredients and chemical composition of experimental diet (% DM or as stated)

اقلام خوراکی Ingredients	مقدار در جیره Amount
یونجه Alfalfa, ground	20.0
کاه گندم Wheat straw	5.0
تفاله چغندر خشک Beet pulp, dried	5.0
ذرت آسیاب شده Ground corn	23.0
جو آسیاب شده Ground barley	23.0
کنجاله سویا Soybean meal	11.0
سبوس گندم Wheat bran	10.0
پیش مخلوط Premix[1]	2.80
اوره Urea	0.20
ترکیبات مواد مغذی و انرژی Chemical composition and energy	
ماده خشک Dry matter	90.2
ماده آلی Organic matter	93.1
پروتئین خام Crude protein	16.2
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	29.9
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	15.8
عصاره اتری Ether extract	2.65
کلسیم Ca	0.80
فسفر P	0.40
انرژی قابل متابولیسم ME (Mcal/kg DM)	2.67

۱ هر کیلوگرم از پیش مخلوط حاوی: ۲۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۱۲۵۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۵۰۰ میلی‌گرم روی، ۳۷۵ میلی‌گرم مس، ۲۵ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۴۰۰۰۰ میلی‌گرم کلسیم، ۲۵۰۰ میلی‌گرم فسفر، ۲۰ میلی‌گرم کبالت، ۲۵ میلی‌گرم ید، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم سدیم به صورت نمک، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم سدیم به صورت بیکربنات سدیم و ۱۰۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان بود.

[1] Vitamin–mineral premix contained per kg: vitamin A 250,000 IU; vitamin D_3 500,000 IU; vitamin E 1000 IU; Mn 1250 mg; Zn 2500 mg; Cu 375 mg; Se 25 mg; Ca 140000 mg; P 2500 mg; Co 20 mg; I 25 mg; Mg 25000 mg; Na 25000 mg as NaCl; Na 25000 mg as $NaHCO_3$ and 1000 mg antioxidant.

نمونه‌گیری از مایع شکمبه

جهت تعیین پارامترهای تخمیری مایع شکمبه شامل pH، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار شکمبه، در روز ۴۵ آزمایش و سه ساعت پس از خوراکدهی وعده صبح، مایع شکمبه توسط لوله مری از

تمامی دام‌ها اخذ شـــد. میزان ۱۰ تا ۲۰ میلی‌لیتر اولیه جهت کاهش اثرات منفی بزاق بر pH دور ریخته شـد. ابتدا pH محتویات شـکمبه بلافاصله توسط دستگاه pH متر سیار اندازه‌گیری شد. سپس محتویات شکمبه از ۴ لایه پارچه متقال عبور داده شد و به‌ازای هر ۱/۲ میلی‌لیتر مایع شکمبه ۰/۳ میلی‌لیتر متافسفریک اسید ۲۵ در صد به آن اضافه شد. نمونه‌ها جهت آنالیز اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Chrompack cp, 9002) به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا روز آنالیز انتقال داده شدند. همچنین، برای بررسی غلظت نیتروژن آمونیاکی شـــکمبه، ابتدا مقدار پنج میلی‌لیتر دیگر مایع شکمبه با پنج میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال کاملاً مخلوط شده و ســـریعاً به فریزر با دمای ۲۰- درجه ســـانتی‌گراد منتقل شـــد (Broderick and Kang, 1980). جهـت انـدازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه، مایع شکمبه صاف شده ابتدا یخ‌گشایی شد و با دور ۵۰۰۰g به‌مدت ۱۰دقیقه ســـانتریفیوژ شـــد و پس از جداســـازی ســـوپرناتانت نمونه‌ها به‌میزان ۵۰ میکرولیتر، آن با پنج میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر فنول و دو میکرولیتر معرف هیپوکلریت اســـید مخلوط و به‌مدت پنج دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه ســانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن، توسط دستگاه اسپکتوفتومتری با طول موج ۶۳۰ نانومتر میزان نیتروژن آمونیاکی اندازه‌گیری و توســـط استانداردهای موجود تصحیح شد (Broderick and Kang, 1980).

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریســـتالین ســـلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صـــافی و آلفا آمیلاز موجود در مایع شـــکمبه بر اســـاس روش‌های موجود تخمین زده شـــد (Agarwal, 2000). روش کار به این صـــورت بود که نمونه‌های مایع شکمبه به‌مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ گردیده و بقایای پلت جمع‌آوری گردید. ســـپس بقایا با تتراکلرید کربن و آنزیم لیزوزیم فرآیند شـــدند و مخلوط آنزیم‌های مایع شـــکمبه در بافر فســـفات در سانتریفیوژ با دور ۲۷۰۰۰g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌دســـت آمد. برای تخمین فعالیت کربوکســـی متیل ســـلولاز، مخلوط واکنش شـــامل یک میلی‌لیتر بافر فســـفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز یک درصد (به عنوان سوبسترا) بود که در دمای ۳۹ درجه ســـانتی‌گراد به‌مدت یک ســـاعت انکوبه گردید. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی‌لیتر شـیرابه شـکمبه و یک میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز یک در صد (به عنوان سوبسترا) بود در دمای ۳۹ درجه سـانتی‌گراد به‌مدت یک سـاعت مورد انکوباسـیون قرار گرفت. به‌منظور محاســـبه فعالیت کاغذ صـــافی، مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید. به‌منظور محاســـبه فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش شـــامل یک میلی‌لیتر بافر فســـفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، نیم میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و نیم میلی‌لیتر محلول نشاسته یک در صد بود که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ســـه میلی‌لیتر محلول دی‌نیترو سالیسیلیک اسید متوقف گردید. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون تخمین زده شد (Miller, 1959). فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید یک میکرومول گلوکز در هر ســـاعت در هر میلی‌لیتر را تحت شـــرایط مخلوط واکنش دارد محاســـبه گردید. پس از متوقف نمودن واکنش توســـط افزودن یک میلی‌لیتر تری‌کلرواســـتیک اسـید، میزان پروتئین نمونه‌ها تعیین گردید (Lowry *et al.*, 1951).

خون‌گیری از دام‌ها

جهـت تعیین اثر ســـطوح مختلف آب در جیره غـذایی بر فراســـنجه‌های خونی بره‌ها (شـــامل گلوکز، پروتئین تام و نیتروژن اوره‌ای خون (BUN)، در روز ۵۰ آزمایش و ســـه ســـاعت پس از خوراک‌دهی وعده صـــبح، خون‌گیری از همه دام‌ها در ونوجکت‌های حاوی ماده ضـــد انعقاد (EDTA) انجام شـــده و آن‌ها بلافاصـــله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه با دور ۱۵۰۰۰g و به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سپس پلاسمای جدا شده به‌داخل میکروتیوب‌های جدید قرار داده شده و تا روز آنالیز فریز گردید.

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

میزان ماده خشـــک و ماده آلی نمونه‌ها بر اســـاس روش‌های استاندارد تعیین گردید (۳). میزان الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) بر اساس روش‌های AOAC (۱۹۹۰) تعیین شد (۳) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) نیز بر اساس روش ون سو ست و همکاران (Van Soest *et al.*, 1991) محاسبه گردید. میزان کلسیم و فســـفر خوراک‌های آزمایشـــی با اســـتفاده از دســـتگاه جذب اتمی (Agilent Company, model AA240FS, USA) تعیین گردید.

تجزیه آماری

داده‌های به‌دســـت آمده با اســـتفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS تجزیه شـــد (SAS, 2005). برای آنالیز داده های مربوط به فعالیت آنزیمی، فراسنجه‌های خونی و شکمبه‌ای مدل آماری زیر مورد استفاده قرار گرفت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در آن Y_{ij}: صــفت مورد نظر، µ: میانگین کل داده‌ها، T_i: اثر ثابت تیمار آزمایشی و e_{ij}: اثر خطای آزمایش می‌باشد.

برای داده‌های عملکرد، وزن اولیه دام‌ها به‌عنوان کوواریت در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به عملکرد ر شد از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$Y_{ij} = T_i + ß_i (X_{ij} - \bar{X}) + e_{ij}$$

که در آن، Y_{ij}: صــفت مورد نظر، µ: میانگین کل، T_i: اثر تیمار آزمایشــی، b: ضــریب رگرســیون، X_{ij}: وزن اولیه با میانگین $\bar{X}$ و e_{ij}: خطای تصادفی می‌با شد. میانگین صفات به‌د ست آمده تو سط آزمون توکی و در سطح معنی‌داری پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های تخمیر شکمبه

اثر ســطوح مختلف رطوبت جیره روی فراســنجه‌های تخمیری شکمبه در جدول ۲ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف رطوبت تأثیری بر pH شکمبه نداشتند (P>۰/۰۵)، در حالی‌که غلظت نیتروژن آمونیاکی تا ســطح ۳۰ درصــد رطوبت جیره به‌صــورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزایش درصــد رطوبت جیره‌های آزمایشی تا سطح ۳۰ درصد باعث افزایش خطی غلظت کل اســیدهای چرب فرار و پروپیونات شــکمبه گردید (P<۰/۰۵)، هرچند غلظت سایر اسیدهای چرب فرار شامل استات، بوتیرات، ایزوبوتیرات، والرات، ایزووالرات و نســبت اســتات به پروپیونات تحت تأثیر درصــد رطوبت جیره ها قرار نگرفت (P>۰/۰۵). مطابق با نتایج پژوهش حاضــر، در مطالعه دیگری عدم تأثیر درصــد رطوبت جیره روی pH شکمبه گزارش شده است (Beiranvand *et al.*, 2016). عدم تأثیر افزودن آب به جیره گوساله‌های شیرخوار روی pH، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار گزارش شده است (Leonardi *et al.*, 2005). غلظت پروتئین خام جیره غذایی و قابلیت هضــم آن و میزان ماده خشک مصرفی عوامل مهم در غلظت آمونیاک شکمبه هستند. افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش سطح رطوبت تا سطح ۳۰ در صد احتمالا به‌خاطر مصرف ماده خشک بیشتر در جیره مذکور بوده است که آن خود به تبع ســبب افزایش مصــرف پروتئین خام شــده اســت (جدول ۵). برخلاف نتایج حاضــر، در مطالعه‌ای افزایش ســرعت عبور مواد از شکمبه با افزایش مصرف خوراک سبب کاهش غلظت آمونیاک و افزایش راندمان میکروبی و افزایش جذب از دستگاه گوارش گردیده اســت (Leonardi *et al.*, 2005). افزایش ســهم مولی پروپیونات با افزایش میزان افزایش رطوبت می‌تواند به‌دلیل افزایش مصرف خوراک در جیره مذکور باشــد (Beiranvand *et al.*, 2016). بیرانوا ند و همکاران (Beiranvand *et al.*, 2016) عنوان کردند که افزودن آب به جیره غذایی گوساله‌های شیرخوار تا سطح ۵۰ در صد، غلظت کل اســیدهای چرب فرار شــکمبه و نســبت مولی اســتات و پروپیونات را افزایش داد، امّا تأثیری بر نسبت مولی بوتیرات، ایزووالرات یا والرات و نسبت استات به پروپیونات نداشت. در آزمایش دیگری، افزودن آب به جیره گو ساله‌های شیری تأثیری بر pH، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار شکمبه نداشت (Leonardi *et al.*, 2005). گاوهای شیری تغذیه شده با جیره حاوی ۵۲ درصد ماده خشک در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با جیره دارای رطوبت کمتر (۷۸ در صد ماده خشک) سهم مولی پروپیونات کمتر و ســهم مولی بالاتری از والرات و ایزوالرات داشتند (Leonardi *et al.*, 2005).

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه

اثر ســطوح مختلف رطوبت جیره روی میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر) شــکمبه بره‌های پرواری در جدول ۳ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی حاوی ســطوح مختلف رطوبت باعث افزایش خطی فعالیت آنزیم کربوکســی متیل ســلولاز و آلفا آمیلاز تا ســطح ۳۰ درصــد رطوبت جیره شــدند (P<۰/۰۵). این در حالی است که فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین ســلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صــافی تحت تأثیر قرار اثرات خطی یا غیر خطی سطح رطوبت قرار نگرفتند (P>۰/۰۵).

سه آنزیم اول یعنی کربوکســی متیل سـلولاز، میکروکریســتالین ســلولاز و آنزیم‌های تجزیه‌کننده کاغذ صــافی در واقع کمپلکس‌های آنزیمی دخیل در تجزیه فیبر و لیگنوسلولز هستند. اگرچه مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر افزودن آب به جیره یا رطوبت آن روی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیکی میکروبی شــکمبه انجام نشــده اســت، به نظر می‌رســد افزودن آب به جیره کامل مخلوط و چســبندگی اجزای خوراک باعث مصــرف بیش‌تر علوفه در بره‌ها و افزایش فعالیت کربوکســی متیل سلولاز شده است. دلیل دیگر این افزایش فعالیت آنزیمی ممکن است به این خاطر باشــد که مواد خوراکی قبل از ورود به شــکمبه مرطوب شده‌اند و لذا فاز تأخیر برای کلونیزه شدن آن‌ها توسط میکروب‌های شــکمبه کاهش یافته اســت. به‌دلیل اینکه آلفا آمیلاز آنزیم دخیل در تجزیه نشاسته در شکمبه می‌باشد، افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با افزایش سطح رطوبت (به خصوص سطح ۳۰ درصد) را می‌توان به‌دلیل افزایش مصــرف خوراک در جیره‌های مذکور (جدول ۵) و به تبع آن افزایش مصــرف کنســانتره که ســوبســترای مورد نیاز برای آنزیم آلفا آمیلاز است نسبت داد. افزایش تولید اسید چرب پروپیونات شکمبه در جیره مذکور می‌تواند تأییدی بر این یافته‌ها باشد.

جدول ۲- اثر جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف رطوبت بر فراسنجه‌های تخمیری مایع شکمبه بره‌های پرواری

Table 2- Effect of different dietary moisture content on rumen fermentation parameters of fattening lambs

صفت Parameter	سطح رطوبت در جیره (درصد) Level of moisture in the diet (%)				خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری P-value	مقایسات متعامد Contrast	
	کنترل Control (10%)	20	30	40			خطی Linear	غیر خطی Quadratic
pH	6.26	6.20	6.14	6.19	0.039	0.35	0.17	0.15
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) NH_3-N (mg/dl)	19.1^{c}	20.1^{bc}	21.5^{a}	20.7^{ab}	0.46	0.04	0.02	0.21
کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Total VFA (mmol/l)	90.1^{b}	93.1^{ab}	96.9^{a}	93.3^{ab}	2.11	0.03	0.04	0.18
استات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Acetate (mmol/l)	55.3	56.5	58.9	57.6	2.07	0.31	0.41	0.65
پروپیونات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Propionate (mmol/l)	17.2^{b}	18.5^{ab}	19.9^{a}	18.9^{ab}	0.64	0.03	0.04	0.23
بوتیرات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Butyrate (mmol/l)	12.2	12.4	12.8	11.6	0.49	0.43	0.57	0.19
ایزوبوتیرات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Isobutyrate (mmol/l)	2.42	2.48	2.53	2.31	0.13	0.54	0.63	0.31
والرات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Valerate (mmol/l)	1.32	1.34	1.29	1.27	0.04	0.28	0.31	0.62
ایزووالرات (میلی‌مول در دسی‌لیتر) Isovalerate (mmol/l)	1.06	1.14	1.10	1.04	0.08	0.61	0.76	0.35
نسبت استات به پروپیونات Acetet:propionate	3.24	3.06	2.97	3.05	0.15	0.67	0.34	0.47

جدول ۳- اثر جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف رطوبت بر فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه بره‌های پرواری (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر)

Table 3- Effect of different dietary moisture content on rumen microbial enzyme activity of fattening lambs (U/min/ml)

صفت Parameter	سطح رطوبت در جیره (درصد) Level of moisture in the diet (%)				خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری P-value	مقایسات متعامد Contrast	
	کنترل Control (10%)	20	30	40			خطی Linear	غیر خطی Quadratic
کربوکسی متیل سلولاز Carboxymethyl cellulase	22.8^{b}	24.7^{ab}	28.6^{a}	26.5^{ab}	1.44	0.03	0.04	0.36
میکروکریستالین سلولاز Microcrystalline cellulase	5.13	5.16	5.68	5.73	0.36	0.43	0.14	0.96
فعالیت تجزیه کاغذ صافی Filter paper degrading	19.1	20.2	24.6	21.2	1.71	0.15	0.13	0.21
آلفا آمیلاز α-amylase	60.1^{b}	61.2^{b}	72.8^{a}	68.2^{ab}	3.14	0.02	0.03	0.34

متابولیت‌های خون

اثر در صد رطوبت جیره بر متابولیت‌های خونی بره‌های پرواری در جدول ۴ ارائه شده است. افزایش سطح رطوبت جیره تأثیر معنی‌داری بر متابولیت‌های شیمیایی خون شامل گلوکز، پروتئین تام و نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) نداشت (P>۰/۰۵). در مطالعات دیگری نیز عدم تأثیر سطوح رطوبت جیره روی غلظت متابولیت‌های خونی گزارش شد (Beiranvand *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر به‌دلیل افزایش غلظت آمونیاک شکمبه (جدول ۲) با افزایش سطح رطوبت جیره تا سطح ۳۰ درصد و همبستگی مثبت آن با غلظت BUN، انتظار بر این بود که غلظت BUN نیز افزایش یابد که دلیل این اتفاق مشخص نیست.

جدول ٤- اثر جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف رطوبت بر متابولیت‌های خونی بره‌های پرواری

Table 4- Effect of different dietary moisture content on blood metabolites of fattening lambs

صفت Parameter	سطح رطوبت در جیره (درصد) Level of moisture in the diet (%)				خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری P-value	مقایسات متعامد Contrast	
	کنترل Control (10%)	20	30	40			خطی Linear	غیر خطی Quadratic
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) Glucose (mg/dl)	77.3	77.7	78.5	77.9	0.46	0.34	0.22	0.29
پروتئین تام (گرم در دسی‌لیتر) Total protein (g/dl) cellulase	8.21	8.25	8.41	8.25	0.16	0.56	0.40	0.76
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) Blood urea nitrogen (mg/dl)	3.68	3.79	3.83	3.77	0.16	0.61	0.67	0.59

مصرف خوراک و عملکرد رشد

همان‌طوری که در جدول ۵ نشان داده شده است افزایش سطح رطوبت جیره تا سطح ۳۰ درصد باعث افزایش خطی میزان ماده خشک، ماده آلی و پروتئین خام مصرفی شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که مصرف NDF و ADF تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در ارتباط با عملکرد رشد بره‌ها، کل افزایش وزن و افزایش وزن روزانه با افزایش درصد رطوبت جیره تا سطح ۳۰ درصد به‌طور خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). هرچند، وزن نهایی و ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر سطح رطوبت جیره قرار نگرفت (P>۰/۰۵). ارتباط مثبتی بین میزان ماده خشک مصرفی و ماده خشک جیره وجود دارد (Leonardi *et al.*, 2005). افزودن آب به جیره سبب کاهش گرد و غبار و چسبندگی اجزای جیره (Arzola-Álvarez *et al.*, 2010)، متراکم شدن و افزایش خوش‌خوراکی آن (Leonardi *et al.*, 2005) و تشویق دام به مصرف خوراک بیش‌تر شده است (Beiranvand *et al.*, 2016; Beiranvand *et al.*, 2018) که مطابق با نتایج مصرف خوراک تا سطح ۳۰ درصد رطوبت در پژوهش حاضر است. در مطالعاتی، آب به‌طور مستقیم به شکمبه اضافه شد و کاهش مصرف خوراک گزارش نگردید (Thomas *et al.*, 1961). افزایش مصرف خوراک آغازین در گوساله‌های شیرخوار با افزایش رطوبت جیره قبل از شیرگیری و کل دوره آزمایشی گزارش شد (Beiranvand *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای، گاوها بر اساس وزن تر در جیره مرطوب، خوراک کمی بیش‌تر را در مقایسه با جیره خشک مصرف کردند که به‌دلیل افزایش مصرف آب خوراک بوده است (Leonardi *et al.*, 2005). در تضاد با نتایج این مطالعه بیان شده است که افزایش رطوبت جیره با افزودن آب مصرف ماده خشک و سایر مواد مغذی را کاهش می‌دهد (Robinson *et al.*, 1990; Miller-Cushon and DeVries, 2009). در توجیه کاهش مصرف خوراک با افزایش سطح رطوبت جیره در این مطالعات بیان شده است که اگر مصرف خوراک با افزودن آب به جیره محدود شود، احتمالاً باعث افزایش مصرف آب نمی‌شود، بنابراین فرض بر این است که آب جذب شده توسط خوراک باعث افزایش وزن خوراک شده و در نتیجه، خوراک مصرفی به اندازه‌ای حجیم شده که باعث پر شدن شکمبه و در نتیجه، کاهش مصرف ماده خشک شده است (Allen, 1996). زمانی که ماده خشک جیره به زیر ۴۵ درصد کاهش می‌یابد به‌دلیل افزایش حجم خوراک و پر شدگی شکمبه مصرف آن کاهش می‌یابد (Robinson *et al.*, 1990; Miller-Cushon and DeVries, 2009). هر چند عوامل مختلفی مانند نوع علوفه و سطح آن در جیره، نسبت علوفه به کنسانتره، اندازه ذرات خوراک، شرایط محیطی مثل رطوبت و دما و اختلاف بین گروه دام از عواملی است که می‌تواند باعث ایجاد اختلاف در نتایج گزارش شده باشد (Leonardi *et al.*, 2005). در مطالعات دیگری نیز افزایش وزن پایانی و افزایش وزن روزانه با افزودن آب به جیره کامل مخلوط گزارش شده است

(Beiranvand *et al.*, 2016; Beiranvand *et al.*, 2018). افزایش وزن روزانه با مصرف جیره حاوی ۷۵ درصد ماده خشک در مقایسه با ۹۰ درصد ماده خشک در گوساله‌های شیرخوار گزارش شد (Beiranvand *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای افزایش سطح رطوبت جیره تأثیری بر وزن میش‌ها نداشت (Ghasemi Nejad *et al.*, 2017).

جدول ۵- اثر جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف رطوبت بر عملکرد رشد بره‌های پرواری

Table 5- Effect of different dietary moisture content on growth performance of fattening lambs

صفت Parameter	سطح رطوبت در جیره (درصد) Level of moisture in the diet (%)				خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری P-value	مقایسات متعامد Contrast	
	کنترل Control (10%)	20	30	40			خطی Linear	غیر خطی Quadratic
مصرف مواد مغذی (گرم در روز) Nutrient intake (g/d)								
ماده خشک Dry matter	1610^{c}	1686^{bc}	1795^{a}	1777^{ab}	51.9	0.03	0.04	0.23
ماده آلی Organic matter	1496^{c}	1569^{bc}	1671^{a}	1654^{ab}	45.5	0.04	0.03	0.19
پروتئین خام Crude protein	262^{c}	273^{bc}	291^{a}	288^{ab}	7.66	0.03	0.04	0.25
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	485	504	539	535	18.7	0.14	0.11	0.21
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	255	266	285	281	11.9	0.16	0.13	0.19
عملکرد رشد Growth performance								
وزن اولیه (کیلوگرم) Initial body weight (kg)	33.2	33.2	33.5	32.7	1.88	-	-	-
وزن نهایی (کیلوگرم) Final body weight (kg)	51.4	52.6	54.1	52.7	1.06	0.34	0.22	0.31
کل افزایش وزن (کیلوگرم) Total weight gain (kg)	18.2^{b}	19.5^{ab}	20.7^{a}	20.1^{ab}	0.71	0.03	0.04	0.18
افزایش وزن روزانه (گرم) Average daily gain (g)	325^{c}	347^{bc}	371^{a}	359^{ab}	11.2	0.03	0.03	0.22
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio	4.97	4.99	4.84	4.95	0.37	0.43	0.36	0.48

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر نشان داد که افزودن آب به جیره کامل مخلوط بره‌های پرواری تا سطح ۳۰ درصد ماده خشک جیره سبب بهبود تخمیر شکمبه به‌واسطه افزایش تولید کل اسیدهای چرب فرار شکمبه و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شده، که به تبع آن، عملکرد رشد بره‌های پرواری بهبود یافت. لذا استفاده از سطح ۳۰ درصد رطوبت در جیره‌های پرواری توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان، در جهت فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Agarwal, N. (2000). Estimation of fiber degrading enzyme. In: L. C. Chaudhary N. Agarwal, D. N. Kamra D. K. Agarwal, editor. Feed microbiology. Izatnagar (India): CAS Animal Nutrition, pp. 278–291.
2. Allen, M. S. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forage by ruminants. *Journal of Animal Science, 74*, 3063–3075. https://doi: 10.2527/1996.74123063x.
3. AOAC. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed., 1th rev.). Gaithersburg (MD):

Association of Official Analytical Chemists.
4. Arzola-Álvarez, C., Bocanegra-Viezca, J. A., Murphy, M. R., Salinas- Chavira, J., Corral-Luna, A., Romanos, A., Ruíz-Barrera, O., & Rodríguez-Muela, C. (2010). Particle size distribution and chemical composition of total mixed rations for dairy cattle: Water addition and feed sampling effects. *Journal of Dairy Science, 93*, 4180‑4188. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2952.
5. Azizi, A., Papi, N., Sharifi, A., Azarfar, A., & Kiani, A. (2016). Effect of different levels of corn steep liquor on the activity of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen liquor and nitrogen metabolism in Moghani-male lambs. *Animal Science Journal (Pajouhesh and Sazandegi), 115*:, 255-270 (In Persian).
6. Azizi-Shotorkhoft, A., Rezaei, J., Papi, N., Mirmohammadi, D., & Fazaeli, H. (2015). Effect of feeding heat-processed broiler litter in pellet-form diet on the performance of fattening lambs. *Journal of Applied Animal Research, 43*, 184–190. https://doi.org/10.1080/09712119.2014.928636.
7. Beiranvand, H., Khani, M., Ahmadi, F., Omidi-Mirzaei, H., Ariana, M., & Bayat, A. R. (2018). Does adding water to a dry starter diet improve calf performance during winter? *Animal, 13*, 959-967. https://doi.org/10.1017/S1751731118002367.
8. Beiranvand, H., Khani, M., Omidian, S., Ariana, M., Rezvani, R., & Ghaffari, M. H. (2016). Does adding water to dry calf starter improve performance during summer? *Journal of Dairy Science, 99*, 1-9. https://doi: 10.3168/jds.2015-10004.
9. Broderick, G., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science, 63*, 64-75. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.
10. Dijkstra, J., Mills, J. A. N., & France, J. (2002). The role of dynamic modelling in understanding the microbial contribution to rumen function. *Nutrition Research Reviews, 15*, 67–90. https://doi.org/10.1079/NRR200237.
11. Ghasemi Nejad, J., Kim, B. W., Lee, B. H., Kim, J. Y., & Sung, K. L. (2017). Effects of water addition to total mixed ration on water intake, nutrient digestibility, wool cortisol and blood indices in Corridale ewes. *Asian-Australas Journal of Animal Science, 30*(10), 1435-1441. https://doi: 10.5713/ajas.16.0705.
12. Khan, M. A., Bach, A., Castells, L., Weary, D., & Von Keyserlingk. M. A. (2014). Effects of particle size and moisture levels in mixed rations on the feeding behavior of dairy heifers. *Animal, 8*(10), 1722–1727. https://doi.org/10.1017/S1751731114001487.
13. Lahr, D. A., Otterby, D. E., Johnson, D. G., Linn, J. G., & Lundquist, R. G. (1983). Effects of moisture content of complete diets on feed intake and milk production by cows. *Journal of Dairy Science, 66*, 1891‑1900. https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)82027-X.
14. Leonardi, C., & Armentano, L. E. (2003). Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science, 86*, 557‑564. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0.
15. Leonardi, C., Giannico, F., & Armentano, L. E. (2005). Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. *Journal of Dairy Science, 88*, 1043–1049. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72772-7.
16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry, 193*, 262–275. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
17. Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry, 31*, 426– 429. https://doi.org/10.1021/ac60147a030.
18. Miller-Cushon, E. K., & DeVries, T. J. (2009). Effect of dietary dry matter concentration on the sorting behavior of lactating dairy cows fed a total mixed ration. *Journal of Dairy Science, 92*, 3292–3298. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1772.
19. NRC. (2007). National Research Council, Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington (DC, USA): National Academy of Sciences.
20. Robinson, P. H., Burgess, P. L., & McQueen, R. E. (1990). Influence of moisture content of mixed rations on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science, 73*, 2916–2921. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78979-5.
21. SAS Institute Inc. (2005). User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
22. Shaver, R. D. (2002). Rumen acidosis in dairy cattle: Bunk management considerations. *Advances in Dairy Technology, 14*, 241‑249.
23. Thomas, J. W., Moore, L. A., Okamoto, M., & Sykes, J. F. (1961). A study of factors affecting rate of intake of heifers fed silage. *Journal of Dairy Science, 44*, 1471. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89909-8.
24. Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74, 3583–3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.